

Preparation of mono:acylated mono-, di- or oligosaccharide - by reacting the primary hydroxyl group with acyl donors in the presence of lipase

Patent Number : DE19626943

International patents classification : C12P-019/00 C07C-069/003 C07H-013/02 C07H-015/238 C12P-007/62 C12P-019/54

• Abstract :
 DE19626943 A Process for the preparation of monoacylated mono-, di- or oligosaccharides, their derivatives and secondary products or decomposition products, comprises reacting the primary OH group with acyl donors in the presence of lipases as enzyme catalyst
 USE - The process is used for regioselective acylation of unprotected sugars.
 ADVANTAGE - The enzyme-catalysed acylation allows highly selective esterification of mono-, di- and oligosaccharides on the primary OH group. This allows good flexibility in the choice of acyl donor and sugar, and uses cheap, non-toxic and easily removable solvents. (Dwg 0/0)

• Publication data :

Patent Family : DE19626943 A1 19980108 DW1998-07 C12P-019/00 4p * AP: 1996DE-1026943 19960704

Priority n° : 1996DE-1026943 19960704

Covered countries : 1

Publications count : 1

• Patentee & Inventor(s) :

Patent assignee : (CHEM) HUELS AG

Inventor(s) : HAASE B; MACHMUELLER G; SCHNEIDER M

• Accession codes :

Accession N° : 1998-064234 [07]

Sec. Acc. n° CPI : C1998-022446

• Derwent codes :

Manual code : CPI: A03-A A10-E07 B04-

C02X

Derwent Classes : A96 B04

• Update codes :

Basic update code : 1998-07

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift

(10) DE 196 26 943 A 1

(51) Int. Cl. 6:

C 12 P 19/00

C 12 P 19/54

C 12 P 7/62

C 07 H 13/02

C 07 C 69/003

C 07 H 15/238

(21) Aktenzeichen: 196 26 943.1

(22) Anmeldetag: 4. 7. 96

(43) Offenlegungstag: 8. 1. 98

(71) Anmelder:

Hüls AG, 45772 Marl, DE

(72) Erfinder:

Schneider, Manfred, Prof. Dr., 42111 Wuppertal, DE;
Haase, Bernhard, 42105 Wuppertal, DE; Machmüller,
Guido, 42579 Heiligenhaus, DE

(54) Enzymkatalytisches Verfahren zur Herstellung von Monocarbonsäureestern der Mono-, Di- oder Oligosaccharide

(57) Es wird ein Verfahren zur Herstellung von Monocarbonsäureestern von Mono-, Di-, Oligosacchariden und -derivaten vorgestellt. Das Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß sowohl freie Carbonsäuren als auch deren kurzkettige Alkyester, deren Triglyceride, deren umgeesterte Triglyceride, deren Anhydride, deren aktivierte Ester sowie Rapsölalkylester (Biodiesel) mit Monosacchariden, Disacchariden, Oligosacchariden, Stärke-, Cellulose- oder Methylcellulosehydrolysaten, Cyclodextrin, Zuckeralkoholen und/oder Glycosiden, insbesondere Glycosidantibiotika, in Gegenwart von Lipasen selektiv zu den Monoestern umgesetzt werden.

DE 196 26 943 A 1

DE 196 26 943 A 1

Beschreibung

Die regioselektive Acylierung von ungeschützten Zuckern ist bisher kaum möglich. Stand der Technik ist die Monoacylierung in Pyridin, wie sie von Therisod und Klibanov (J. Am. Chem. Soc. 108 (1986) 5638–40) beschrieben wird. Auch die Monoacylierung von Oximestern (R. Pulido, F. L. Ortiz, V. Gotor, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, (1992) 2891–7) und die Lipase-katalysierte Monoveresterung von "Phenylborsäurekomplexen" verschiedener Monosaccharide (I. Ikeda, A.-M. Klibanov, Biotechnol. Bioeng. 42 (1993) 788–91) sind bekannt. Allen Verfahren ist jedoch gemeinsam, daß sie im technischen Maßstab nur sehr aufwendig durchführbar und damit ökologisch und/oder ökonomisch nicht konkurrenzfähig sind.

Enzymatische Herstellungsverfahren für monoacylierte Alkylglycoside sind bereits bekannt, hier seien die Arbeiten von O. Kirk et al., EP 0 394 280, und T. Brenkman et al., WO 94/01575, zitiert. Diese Verfahren lassen sich jedoch nicht auf die Herstellung von monoacylierten freien Zuckern übertragen. Die enzymkatalysierte Umsetzung von Fettsäuren mit Zuckern in tertiären Alkoholen ist durch nur unzureichende Umsätze gekennzeichnet und nicht selektiv genug (FR 2 646 439), außerdem sind lediglich freie Fettsäuren als Acyldonatoren einsetzbar.

Es bestand daher die Aufgabe, ein enzymkatalytisches Verfahren zu finden, das zur hochselektiven Verestierung von Mono-, Di- und Oligosacchariden und Derivaten an der primären Hydroxylgruppe geeignet ist, eine hohe Flexibilität hinsichtlich der einsetzbaren Acyldonatoren und Zucker erlaubt und die Nutzung billiger, leicht zu entfernender, toxikologisch unbedenklicher Lösemittel ermöglicht.

Die Aufgabe wird mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gelöst. Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von monoacylierten Mono-, Di- oder Oligosacchariden, deren Derivaten und deren Folge- bzw. Abbauprodukten, dadurch gekennzeichnet, daß die primäre Hydroxylgruppe in Gegenwart von Lipasen mit Acyldonatoren umgesetzt wird. Das Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß sowohl freie Carbonsäuren als auch deren kurzkettige Alkylester, deren Triglyceride, deren umgeesterte Triglyceride, deren Anhydride, deren aktivierte Ester sowie Rapsölalkylester (Biodiesel) mit Monosacchariden, Disacchariden, Oligosacchariden, Stärke-, Cellulose- oder Methylcellulosehydrolysaten, Cyclodextrin, Zuckeralkoholen und/oder Glycosiden, insbesondere Glycosidantibiotika, in Gegenwart von Lipasen selektiv zu den Monoestern umgesetzt werden.

Die freien Carbonsäuren haben eine Kettenlänge von 4 bis 22, vorzugsweise 8 bis 18 Kohlenstoffatomen, wobei die Alkylketten gesättigt oder ungesättigt, verzweigt oder unverzweigt, funktionalisiert (z. B. Ricinol- oder Hydroxystearinsäure) oder unfunktionalisiert sind. Die zur Umsetzung verwendbaren kurzkettigen Alkylester enthalten 1 bis 6 Kohlenstoffatome in dem zugrundeliegenden Alkohol. Bevorzugt werden Methyl- und Ethylester und/oder deren Gemische. Weiterhin können Triglyceride und/oder umgeesterte Triglyceride, Anhydride (cyclisch oder acyclisch, gemischt oder ungemischt), aktivierte Ester (insbesondere Vinylester und Isopropenylester und deren Gemische) der genannten Carbonsäuren sowie Rapsölalkylester (sog. Biodiesel) eingesetzt werden.

Insbesondere sind als Monosaccharide Glucose, Man-

nose, Galactose, Fructose, Ribose und Arabinose, als Disaccharide Saccharose, Cellobiose, Lactose und Maltose, als Oligosaccharide bzw. Derivate und Folgeprodukte Stärke-, Cellulose- und Methylcellulose-hydrolysate, lösliche Stärke und Cyclodextrin, als bevorzugte Zuckeralkohole Sorbit und Mannit und als Glycoside die Antibiotika Streptomycin und Strukturanaloga zu nennen.

Die für das erfindungsgemäße Verfahren geeigneten Enzyme sind Lipasen entweder tierischen, pflanzlichen oder mikrobiellen Ursprungs, von Linien wie Aspergillus, Rhizopus, Streptomyces, Bacillus, Pseudomonas, Enterobacterium, Chromobacterium, Geotrichum, Penicillium, Mucor miehei, Candida und Humicola. Beispiele für bevorzugte Enzyme sind Lipasen aus Mucor miehei und Candida antarctica, z. B. NOVOZYM SP 435 von Novo Nordisk A/5, Papain, PRONASE, IMMOBILISIERTE LIPASE PS AUF TOYONITE-200-P oder Subtilisin, PPL, ACID-ESTERASE (AMANO), LPL und Proteinase K. Die Enzyme können hier entweder nativ oder immobilisiert eingesetzt werden.

Die für das erfindungsgemäße Verfahren geeigneten Lösemittel sind solche, die schwach polar bis polar sind. Die Zucker müssen nicht zwangsläufig in den erfindungsgemäßen Lösemitteln löslich sein. Als Beispiele für erfindungsgemäße Lösemittel sind zu nennen Tetrahydrofuran, Aceton, Diethylether, Methyl-tert-butylether, Fettsäuremethylester, N-Methylpyrrolidon, Amylalkohol, Dimethoxyethan, Diethylenglycoldimethylether, 1,3-Dioxolan, Ethylenkarbonat, Sulfolan, Dimethylcarbonat, überkritisches Kohlendioxid und deren Gemische jeweils mit Gehalten von 0 bis 3, vorzugsweise 0,01 bis 2 Gew.-% Wasser.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich weiterhin dadurch aus, daß Acyldonatoren und Zucker in einer Stöchiometrie zwischen 2 : 1 und 1 : 2, bevorzugt 1 : 1, eingesetzt werden, das Verhältnis von Lösemittel zu Reaktanden zwischen 2 ml pro 10 mmol Edukte und 200 ml pro 10 mmol Edukte, bevorzugt 20 bis 100 ml pro 10 mmol Edukte, liegt und das Enzym mit einer Einsatzkonzentration von 100 bis 1000 PLU (Propylaurate-Units nach ext-SM-0342-GB/01), bevorzugt 200 bis 800 PLU pro mmol Reaktanden eingesetzt wird.

Die Reaktion wird bei einer Temperatur, bei der die erfindungsgemäßen Enzyme optimal arbeiten, geführt. Bevorzugt sind hier Temperaturen von 20 bis 100°C, besonders bevorzugt 20 bis 80°C. Die Reaktion wird in der Art geführt, daß die Reaktanden im Lösemittel gemischt werden, wobei das Enzym, soweit es trägerfixiert ist, vorgelegt wird und dann auch wiederholt eingesetzt wird, oder, wenn es sich um ein natives Enzym handelt, ebenfalls der Mischung zugesetzt wird. Werden Carbonsäuremethylester eingesetzt, so kann das frei werdende Methanol bei Auswahl des richtigen Lösemittels, beispielsweise Carbonsäuremethylester oder N-Methylpyrrolidon, unter Vakuum oder durch Einsatz von Molsieb entfernt und damit der Umsatz und die Reaktionszeit optimiert werden.

Die folgenden Beispiele sollten die Erfindung erläutern, sie jedoch nicht darauf einschränken:

Beispiel 1

Synthese von 6-O-Capryloyl-d-glucoseester

In einem 250-ml-Rundkolben wurden 1,80 g Glucose mit 1,70 g Caprylsäurevinylester in 100 ml THF mit 1,0 g Novozym 435 bei 50°C umgesetzt. Das Reaktionsge-

misch wurde heiß filtriert und das Lösemittel bei 60°C entfernt. Das Rohprodukt, 2,02 g eines blaßgelben Pulvers, besteht laut HPLC ($R_T = 4,9$ min, RP-18, MeOH/H₂O = 95 : 5 (v/v), 0,5 ml/h, Temp. Streulichtdetektor: 75°C) aus 82,6% Zuckerester, 7,4% Glucose, ca. 10% Fettsäure, 0% Vinylester.

Das durch Umkristallisation aus Aceton gereinigte Produkt (Reinheit > 98%) konnte mit Hilfe eines ¹³C NMR Spektrums charakterisiert werden. ¹³C{¹H} NMR/DMSO-d₆/TMS, 25°C): δ = 14,5 ppm (CH₃), 22,6 ppm (ω-2-C), 25,1 ppm (β-C), 28,9–29,0 ppm (γ- und δ-C), 31,7 ppm (ω-3-C), 34,1 ppm (α-C), 64,4 ppm (C-6), 69,7 ppm (C-4), 7,13 ppm (C-5), 72,8 ppm (C-2), 73,5 ppm (C-3), 92,9 ppm (C-1) und 173,5(C=O).

ster in Gegenwart von 1,1 g Novozym SP 435 umgesetzt. Die Reaktionsführung erfolgte 7 d unter Rühren (KPG-Rührer) bei 60°C. Nach 7 d wurde vom Enzym abfiltriert und das Lösemittel im Ölumpenvakuum abdestilliert. Man erhielt 3,9 g (43%) 6'-O-Lauroylsaccharose.

Beispiel 2

6-O-Lauroylglucose aus freier Glucose und Laurinsäuremethylester

1,8 g (10 mmol) Glucose wurden in 100 ml THF mit 3,12 g (15 mmol) Laurinsäuremethylester in Gegenwart von 0,98 g Novozym SP 435 umgesetzt. Die Reaktionsführung erfolgte 24 h unter Rühren (KPG-Rührer) bei 60°C. Um das Gleichgewicht zu verschieben und die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen, wurde das bei der Umesterung freiwerdende Methanol durch die Zufügung von Molsieb (4 Å) gebunden. Nach 24 h wurden die Feststoffe abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurden 3,9 g (85%) 6-O-Lauroylglucose erhalten.

Das Produkt wurde durch Umkristallisation aus Aceton gereinigt.

Umsetzungen von Galaktose und Mannose erfolgten adäquat mit ähnlicher Ausbeute.

Beispiel 3

6-O-Lauroylglucose aus freier Glucose und Laurinsäuremethylester-Entfernung des entstandenen Methanols durch Abdestillation

1,8 g (10 mmol) Glucose wurden in 100 ml N-Methylpyrrolidon mit 3,12 g (15 mmol) Laurinsäuremethylester in Gegenwart von 1,0 g Novozym SP 435 umgesetzt. Die Reaktionsführung erfolgte 24 h unter Rühren (KPG-Rührer) bei 60°C. Um das Gleichgewicht zu verschieben und die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen, wurde das bei der Umesterung freiwerdende Methanol durch Anlegen eines Membranpumpenvakuums abgezogen und in einer Kühlfaß (Trockeneisgekühlt) gesammelt. Nach 24 h wurde von unumgesetzter Glucose abfiltriert und das Lösemittel im Ölumpenvakuum abdestilliert. Es wurden 3,9 g (85%) 6-O-Lauroylglucose erhalten.

Das Produkt wurde durch Umkristallisation aus Aceton gereinigt.

Umsetzungen von Galaktose und Mannose erfolgten adäquat mit ähnlicher Ausbeute.

Beispiel 4

6'-O-Lauroylsaccharose aus freier Saccharose und Laurinsäuremethylester durch irreversiblen Acyltransfer

3,4 g (10 mmol) Saccharose wurden in 10 ml N-Methylpyrrolidon mit 3,34 g (15 mmol) Laurinsäurevinyle-

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von monoacylierten Mono-, Di- oder Oligosacchariden, deren Derivate und deren Folge- bzw. Abbauprodukten, dadurch gekennzeichnet, daß die primäre Hydroxylgruppe in Gegenwart von Lipasen mit Acyldonatoren umgesetzt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Acyldonatoren freie Carbonsäuren mit einer Alkylkettenlänge von 4 bis 22 Kohlenstoffatomen, deren kurzkettige Alkylester mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen in der zugrundeliegenden Alkoholgruppe oder deren umgeesterte oder unumgeesterte Triglyceride eingesetzt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Acyldonator ein Vinyl- und/oder Isopropenylester von Carbonsäuren, die 4 bis 22 Kohlenstoffatome enthalten, eingesetzt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Acyldonator ein Carbonsäureanhidrid eingesetzt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Acyldonator ein Rapsölalkylester von Alkoholen mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, insbesondere der Rapsölmethylester, eingesetzt wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Monosaccharid Glucose, Mannose, Galactose, Fructose, Ribose oder Arabinose eingesetzt wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Disaccharid Saccharose, Cellobiose, Lactose oder Maltose eingesetzt wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Oligosaccharid Stärke-, Cellulose-, Methylcellulose-hydrolysat oder lösliche Stärke eingesetzt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß Cyclodextrin oder Zuckerkohole, insbesondere Sorbit und/oder Mannit, eingesetzt werden.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß Glycosid-Antibiotika, insbesondere Streptomycin oder Strukturanaloga, eingesetzt werden.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß Lipasen tierischen, pflanzlichen oder mikrobiellen Ursprungs eingesetzt werden.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktion in einem Lösemittel, daß schwach polar bis polar ist, durchgeführt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktion in einem Lösemittel, das aus der Gruppe Tetrahydrofuran, Aceton, Diethylether, Methyl-tert-butylether, Fett säuremethylester, N-Methylpyrrolidon, Amylalkohol, Dimethoxyethan, Diethyenglykoldimethylether, 1,3-Dioxolan, Ethylenkarbonat, Sulfolan, Dime-

thylcarbonat, überkritisches Kohlendioxid und deren Gemische jeweils mit einem Wassergehalt bis zu 2 Gew.-% ausgewählt ist, durchgeführt wird.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65